



**Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

**Avaliação da associação entre o Vírus do Papiloma Humano e o
carcinoma colo-retal em doentes abaixo de 50 anos e sem
predisposição familiar**

Leonardo Cunha Costa

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
MEDICINA TROPICAL**

OUTUBRO, 2018



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Avaliação da associação entre o Vírus do Papiloma Humano e o
carcinoma colo-retal em doentes abaixo de 50 anos e sem
predisposição familiar

Autor: Leonardo Cunha Costa

Orientadora: Profa. Dra. Filomena Pereira

Coorientadora: Profa. Dra. Cláudia Leal Macedo

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do
grau de mestre em medicina tropical

Leonardo Cunha Costa

Avaliação da associação entre o Vírus do Papiloma Humano e o carcinoma colo-
retal em doentes abaixo de 50 anos e sem predisposição familiar



Dedicatória

Ao meu pai, pelo exemplo de integridade.

À minha mãe, pelo carinho e cuidado.

À Flávia, pelo estímulo diário.

Aos meus filhos, pela paciência em tolerar os momentos de ausência.

Agradecimentos

Às minhas orientadoras Profa. Dra. Filomena Pereira e Profa. Dra. Cláudia Macedo pelo incentivo, dedicação, correção e sobretudo pelos ensinamentos.

À toda equipe o Instituto de Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, em especial aos professores que refizeram os caminhos de Pedro Alves Cabral e nos ofertaram horas de intenso convívio e aprendizado.

À toda equipe da pós graduação e extensão da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia que com grande esforço, proporcionou a oportunidade deste mestrado Brasil - Portugal.

Resumo

O cancro colo-retal representa um dos tumores mais frequentes no mundo, atingindo aproximadamente um milhão e meio de pessoas em cada ano e sendo classicamente mais prevalente em indivíduos acima dos 60 anos. Nas últimas décadas tem sido observada uma mudança epidemiológica no comportamento desta neoplasia com aumento progressivo no número de casos novos em doentes jovens. Os fatores que ocasionaram esta mudança não são claros. Uma das hipóteses para explicar tal fato é que o vírus do papiloma humano (HPV) poderia ter um papel na carcinogénese dos tumores colo-retais. O presente estudo avaliou a presença de material genético de HPV em amostras biológicas de tumores colo-retais de doentes abaixo de 50 anos e sem predisposição familiar para neoplasia por técnica de PCR. Foram selecionados 19 doentes, sendo o reto (36%) o sítio mais frequente. Das 19 amostras selecionadas, 3 apresentaram DNA degradado e não foram passíveis de análise. Nas restantes 16 não foi detetada a presença de DNA de HPV. Os resultados deste estudo estão em concordância com a literatura médica sobre este assunto, uma vez que se relatam índices variados de infeção por HPV com grandes diferenças regionais. Até ao momento os dados disponíveis não permitem estabelecer uma relação causal entre o HPV e cancro colo-retal.

Palavras Chave: Vírus do papiloma humano, cancro colo-retal, cancro colo-retal em jovens, reação em cadeia da polimerase

Abstract

Colorectal cancer represents one of the most frequent tumors in the world, reaching approximately one and a half million people each year and classically affecting individuals over 60 years of age. In the last decades, an epidemiological change was observed in the behavior of this carcinoma, with progressive increase in the number of new cases in young patients. The factors that led to this change are not clear. One of the hypotheses trying to explain this fact is that human papilloma virus could play a role in the carcinogenesis of colorectal tumors. In the present study, a PCR technique was used to detect the presence of HPV genetic material in biological samples from colorectal tumors of patients aged less than 50 years and without familiar predisposition for carcinoma. We selected 19 patients with colorectal carcinoma, the rectum being the most frequent area affected (36%). Of the 19 selected samples, three presented degraded DNA and could not be analyzed. The other 16 samples were negative for the presence of HPV DNA. The findings of this study are in agreement with the medical literature, since most authors referring this subject found variable HPV positivity indexes and a great regional variation. Taking into account the available data, it is not possible to establish a causal relationship between HPV and colorectal cancer.

Key-Words: Human papilloma virus, colorectal cancer, colorectal cancer in young people, polymerase chain reaction

Índice

Dedicatória.....	i
Agradecimento.....	ii
Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Lista de Abreviaturas.....	vii
1- Introdução	01
1.1 - O Carcinoma Colo-retal.....	02
1.1.1 - Epidemiologia.....	02
1.1.2 - Patogénese.....	03
1.2 - O Vírus do Papiloma Humano.....	06
1.2.1 - Estrutura.....	06
1.2.2 - Classificação.....	08
1.2.3 - Relação com desenvolvimento de neoplasias.....	09
1.2.4 - Relação com o cancro colo-retal.....	11
1.2.5 - Aspectos moleculares da fisiopatogenia.....	12
2. Justificação do estudo.....	16
3. Objetivos.....	17
3.1- Objetivos gerais.....	17
3.2 - Objetivos específicos.....	17

4. População, materiais e métodos.....	18
4.1 - Tipo de estudo.....	18
4.2 - População do estudo.....	18
4.3 - Critérios de inclusão.....	18
4.4 - Critérios de exclusão.....	19
4.5 - Metodologia da colheita de dados.....	19
4.6 - Metodologia de armazenamento e envio.....	20
4.7 - Metodologia de análise por técnica de PCR.....	21
4.8 - Critérios para classificação.....	23
4.8.1 - Grau nuclear.....	23
4.8.2 - Estadio.....	24
4.8.3 - Localização do tumor.....	25
5 - Resultados.....	26
5.1 - Características demográficas.....	26
5.2 - Características clínico patológicas.....	26
5.3 - Pesquisa de HPV.....	28
6 - Discussão.....	31
7 - Conclusão.....	38
8 - Referências.....	39

Lista de Abreviaturas

AJCC: (American Joint Committee on Cancer) comitê conjunto americano de cancro

APC: (*adenomatous polyposis coli*) polipose colônica adenomatosa

CCR: cancro colo-retal

HNPCC: (*hereditary nonpolyposis colorectal cancer*) cancro colo-retal hereditário não adenomatoso

HPV: (*human papillomavirus*) vírus do papiloma Humano

SEER: (*Surveillance, Epidemiology, and End Results Reporting*) relatórios de vigilância, epidemiologia e resultados finais

DNA: (*deoxyribonucleic acid*) ácido desoxirribonucleico

IARC: (*International Agency for Research on Cancer*) agência internacional de pesquisa do cancro

ICON-S: (*International Collaboration on Oropharyngeal Cancer Network for Staging*) estudo colaborativo internacional para estadiamento do cancro de orofaringe.

Gene RB: gene do retinoblastoma humano

LCR: (*long control region*) região de controle longa

MMR: (*mismatch repair genes*) genes de reparo de erro

pRB: proteína do retinoblastoma

PCR: (*Polymerase Chain Reaction*) reação em cadeia da polimerase

TNM: (*tumor, node, metastase*) tumor, linfonodo, metástase

1 - Introdução

O carcinoma colo-retal (CCR) é um dos tumores mais prevalentes no mundo, anualmente afeta quase um milhão e meio de pessoas e ocasiona mais de 600 mil mortes, com incidência elevada nos Estados Unidos da América e na Europa e com um maior número de casos em homens após os 50 anos (1, 2). Apesar de sua relevância epidemiológica, o conhecimento sobre a sua patogénese é ainda escasso. Em aproximadamente 10% dos casos pode identificar-se uma predisposição genética bem definida, caracterizada por uma mutação germinativa que, em última análise, ocasiona o desenvolvimento de carcinoma colo-retal em doentes jovens (3). Porém, na maioria dos casos, o processo de carcinogénese é apenas parcialmente compreendido e novos estudos são necessários.

Nas últimas décadas observamos uma mudança epidemiológica no carcinoma colo-retal com estudos em várias partes do globo a demonstrarem um aumento da sua incidência em doentes abaixo dos 50 anos (4-9). Este facto ainda é mal compreendido, mas alguns autores acreditam que estamos diante de uma entidade clínica distinta (10), para a qual podem contribuir vários fatores etiológicos como poluição, obesidade, inatividade física e a presença de outro fator potencialmente carcinogénico como, por exemplo, um agente infeccioso (11-13).

De entre os possíveis vírus relacionados com a carcinogénese do CCR, o vírus do papiloma humano (HPV) tem vindo a destacar-se na literatura. O HPV considera-se desde há muito tempo claramente envolvido na carcinogénese de tumores de células escamosas, em especial nos carcinomas do colo de útero, e mais recentemente nas neoplasias da cavidade oral (14, 15). Porém, as evidências da relação do HPV com o carcinoma colo-retal são controversas. Na literatura existem alguns estudos que investigaram a presença de material genético dos genótipos 16 e 18 do HPV em amostras tumorais com resultados muito variáveis.

O estudo de Salepci and Yazici (2009) descreveu a presença de ácido desoxirribonucleico (DNA) de HPV em 82,14% das amostras de tumores colo-retais. No entanto, o estudo de Snietura and Waniczek não detetou a presença de DNA de HPV em nenhuma amostra tumoral (16, 17).

O presente estudo tem por objetivo investigar a presença de DNA de HPV 16 e 18 por técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em material de biópsia de indivíduos com neoplasia colo-retal abaixo de 50 anos e sem história familiar. Este estudo parte do pressuposto de que os portadores de cancro intestinal abaixo de 50 anos e sem história familiar de neoplasia constituem um grupo com comportamento epidemiológico, clínico e de patogénese distinta e pouco estudado.

1.1 - O Carcinoma colo-retal

1.1.1 - Epidemiologia

O carcinoma colo-retal é um dos cinco cancros mais prevalentes no mundo, representando aproximadamente 10% de todas as neoplasias malignas. Globalmente, é o terceiro tumor maligno mais diagnosticado entre os homens e o segundo entre as mulheres com 1,4 milhões de casos em 2012 (1). Uma grande variação regional na distribuição dos casos novos pelo mundo está descrita, com maior incidência na Austrália, Nova Zelândia, América do Norte e Europa e menor incidência na África e na Ásia Central (18). A taxa de incidência global por 100 mil habitantes é de 21 casos para homens e de 17,6 para mulheres (18).

O Instituto Nacional do Câncer do Brasil estimou para o ano de 2016 cerca de 16610 casos novos entre homens e 17620 entre as mulheres. Estes valores correspondem a um risco estimado de 16,84 casos novos para cada 100 mil homens e 17,1 para cada 100 mil mulheres. Já o estado da Bahia tem uma estimativa de incidência para 2016 menor

do a que média nacional com 7,13 casos por 100 mil homens e de 9,18 casos por 100 mil mulheres (80).

Dados dos Estados Unidos da América têm mostrado um aumento na incidência de tumores colo-retais em doentes abaixo dos 50 anos de idade e redução na sua incidência nas restantes idades (4,5). O aumento na incidência de carcinoma colo-retal em indivíduos com menos de 50 anos também tem sido demonstrado em países com poucos recursos (6).

A mortalidade por carcinoma colo-retal apresenta uma redução gradual nos Estados Unidos da América desde a década de 80 e dados do *Surveillance, Epidemiology, and End Results Reporting* (SEER), vinculado ao *National Cancer Institute* dos Estados Unidos da América, têm demonstrado que 62% dos indivíduos com cancro colo-retal estão vivos 5 anos após o diagnóstico (6). Infelizmente, a mortalidade tem aumentado na América do Sul e na Europa oriental nos últimos anos (19).

1.1.2 – Patogénese

A patogénese do carcinoma colo-retal é complexa e envolve uma interação pouco compreendida entre fatores ambientais, hábitos alimentares e fatores genéticos individuais. Apesar da complexidade das interações podemos reconhecer três padrões de desenvolvimento do carcinoma colo-retal: os síndromas genéticos com predisposição para CCR, as doenças esporádicas e o último grupo no qual os doentes possuem uma história familiar, mas não têm critérios para síndromas genéticos.

Os síndromas genéticos relacionados com o cancro colo-retal representam entre 5 a 10 % dos casos (3). Os doentes incluídos neste grupo têm vias de carcinogénese bem compreendidas, com mutações germinativas em genes supressores de tumor ou em genes de reparação. Estes síndromas podem ser divididos em dois subgrupos com base na presença de pólipos como maior manifestação da doença. No primeiro grupo, com predomínio de pólipos, estão inseridas a polipose familiar adenomatosa (FAP) e a

polipose associada a MUTYH. Já no segundo grupo, no qual os pólipos não são predominantes, podemos incluir o síndrome de Lynch.

A polipose familiar adenomatosa representa 1% de todos os casos de neoplasia colo-retal nos Estados Unidos da América (20). Esta é uma doença autossómica dominante com elevada penetração, caracterizada pelo aparecimento de um grande número de pólipos, habitualmente mais de 100 e que invariavelmente evoluem para adenocarcinoma na quarta década de vida.

A base genética deste síndrome é a mutação do gene supressor *adenomatous polyposis coli* (APC), localizado no cromossoma 5q21(21).

Outro síndrome genético que merece menção é a polipose associada MUTYH. Esta situação clínica representa menos de 1% dos casos das neoplasias colo-retais e é caracterizada pela mutação bialélica do gene MUTYH. Os indivíduos afetados desenvolvem entre 10 e 100 pólipos e têm 70 a 75 % de possibilidades de desenvolver carcinoma colo-retal durante a vida. Estudos recentes sugerem que esta entidade clínica pode explicar uma parcela importante de casos familiares, onde não são encontradas mutações germinativas clássicas (22).

O síndrome de Lynch ou *Hereditary nonpolyposis colorectal cancer* (HNPCC) representa 3% de todos os casos de neoplasia colo-retal (23). Este síndrome é autossómico dominante, caracterizado pelo aparecimento de tumores do cólon em doentes jovens, habitualmente com menos de 50 anos e com uma média de 48 anos, com 70% dos casos a atingirem o cólon direito e o ângulo hepático (24).

Os doentes portadores do síndrome de Lynch apresentam um risco elevado de desenvolver outros tumores como tumores do endométrio, ovário e estômago (25), sendo que na altura do diagnóstico 7 a 10 % dos doentes apresentam tumores sincrónicos (26). A lesão genética estrutural básica do é a perda de função dos genes de reparação do DNA conhecidos como “*mismatch repair genes*” (MMR). O defeito na reparação genética ocasiona a acumulação de mutações que são expressas no DNA, como a elevada frequência de repetições de curtas sequências de nucleótidos, ou seja alta instabilidade de microssatélites (27). O diagnóstico deste síndrome, conforme detalhado na tabela 1, pode

ser realizado utilizando dados clínicos como os critérios de Amsterdão que levam em conta a presença de mais de uma geração atingida, múltiplos familiares com cancro colo-retal, cancro de endométrio, ureter ou pelvis renal, sendo que pelo menos um doente deve ter menos de 50 anos (28) conforme figura abaixo.

Figura 1- Critérios de Amsterdão II para o diagnóstico de síndrome de Lynch

Identificação clínica do HNPCC* requer três ou mais familiares com neoplasia (CCR, endométrio, ureter ou pelvis renal) associado aos seguintes	
1	O doente dever ser familiar em primeiro grau de outros dois
2	Duas ou mais gerações afetadas
3	Um ou mais indivíduos afetados com idade inferior a 50 anos
4	A.P.C excluído
5	Tumores examinados histologicamente

**Hereditary nonpolyposis colorectal cancer*

A maioria dos indivíduos portadores de tumores colo-retais não apresentam história familiar ou predisposição genética para neoplasia e são considerados casos esporádicos. Os doentes deste grupo geralmente são diagnosticados após os 50 anos, possuem dieta rica em carnes vermelhas e apresentam outros fatores de riscos ambientais associados (29). Os vários estudos em genética, em especial os de *Fearon and Vogeslstein*, sugerem um processo de carcinogénese em múltiplas etapas com acumulação de mutações somáticas, sendo precoces estas mutações no gene APC e tardias no gene supressor p53 (30). Dentro deste contexto de acumulação progressiva, várias outras modificações genéticas têm sido observadas, como as alterações nos genes RAS, SRC, MYC e hipermetilação dos genes MMR (31-34). Em linhas gerais, o processo de carcinogénese nos casos esporádicos é um processo lento, marcado pela soma de

inúmeras mutações variadas que geram neoplasias em indivíduos idosos através caminhos genéticos diversos.

O terceiro grupo inclui os doentes que apresentam história familiar de carcinoma colo-retal, mas sem critérios clínicos e moleculares para síndromas genéticos. Estes apresentam risco elevado de carcinoma colo-retal, que é 1,7 vezes maior do que na população em geral. Este grupo é muito heterogéneo e pode apresentar alterações genéticas encontradas em outros grupos.

A literatura tem mostrado um aumento progressivo do número de casos novos em doentes abaixo dos 50 anos e embora o conhecimento sobre o processo de carcinogénese neste grupo especial tenha aumentado muito, ainda existem várias lacunas. No entanto, parece claro que existe uma diferença nítida na carcinogénese deste grupo, quando se compara com o grupo dos doentes idosos com neoplasia esporádica. Nos jovens deve existir uma predisposição genética ou um fator catalizador do processo que leva um conjunto de mutações a aparecer mais precocemente. A partir deste pressuposto, coloca-se a hipótese do Vírus Papiloma Humano (HPV) fazer parte do processo de carcinogénese do cancro colo-retal, pelo menos quando se diagnostica em indivíduos como menos de 50 anos. Para estudarmos tal fato, escolhemos como população alvo os doentes abaixo dos 50 anos e optamos por excluir todos os que apresentam predisposição familiar e consequentemente aqueles que podem ser portadores de mutações germinativas.

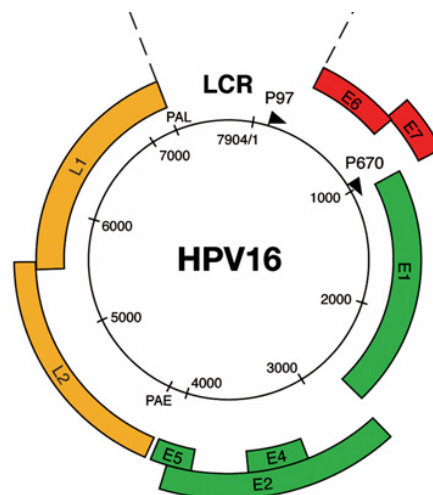
1.2 - O Vírus do Papiloma Humano

1.2.1 Estrutura

O HPV é um vírus DNA de cadeia dupla, sem envelope, pequeno, com aproximadamente 55 nm e 7900 pares de base, que pertence à família dos papovavírus. O capsídeo é icosaédrico e é composto por pelo menos duas proteínas, L1 e L2.

Na observação, a microscopia eletrônica tem forma semelhante a uma bola de golfe. O genoma deste vírus é funcionalmente dividido em 3 regiões, sendo que duas têm a capacidade de codificar proteínas e a terceira parece estar mais envolvida no controlo da transcrição dos genes. As regiões codificadoras expressam 8 proteínas, sendo duas de aparecimento tardio no ciclo viral chamadas L1 e L2, as quais formam a estrutura do capsídeo, tal como referido acima. As restantes 6 proteínas são traduzidas de forma precoce, sendo denominadas de E1, E2, E4, E5, E6, E7. Elas são responsáveis pela infetividade, proliferação viral e manutenção do DNA viral da célula hospedeira. A terceira região do genoma viral, não codificadora, é conhecida como LCR (*long control region*) e controla a transcrição dos genes virais (35). De forma esquemática, todos os vírus HPV apresentam a estrutura ilustrada na figura 2, correspondente ao seu genótipo 16.

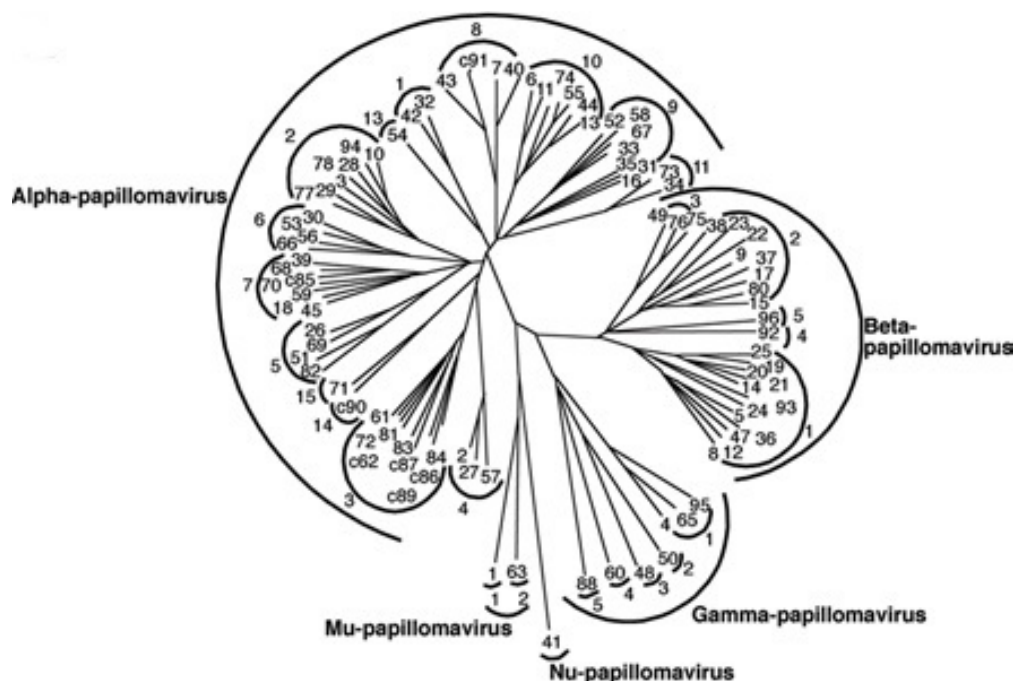
Figura 2. Representação esquemática do DNA circular do HPV 16 adaptação de Doorba J. (2006) (36)



1.2.2 Classificação

Atualmente estão descritos mais de 200 genótipos de HPV, dos quais 85 estão bem estudados (35). A tipagem do HPV é baseada no sequenciamento do DNA, sendo considerado um novo genótipo quando se observa uma diferença de mais de 10 % entre os pares de base da região que codifica o capsídeo (L1). Uma diferença no DNA da região L1 entre 2 e 10 % caracteriza um subtipo (37). A grande família HPV é dividida em vários géneros, sendo que 90 % dos genótipos descritos pertencem ao género Alpha e Beta. Os Beta papilomavírus infetam a pele do homem, mas não ocasionam lesões aparentes em indivíduos imunocompetentes. Já em doentes com algum grau de imunossupressão podem ocasionar epidermodisplasia verrucosa. Os Alpha papilomavírus representam o maior grupo de HPV, sendo que neste género estão incluídos 30 tipos de HPV que infetam o colo do útero e que podem ocasionar neoplasia. Estes papilomavírus relacionados com carcinomas dividem-se, quanto ao potencial carcinogénico, em alto e baixo risco. No grupo dos HPV de alto risco estão incluídos os genótipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68. O genótipo 16 é o que mais se relaciona com as neoplasias de colo de útero, sendo responsável por aproximadamente 50% dos casos. Já os tipos de baixo risco raramente ocasionam lesões carcinomatosas, mas têm importância clínica por ocasionarem verrugas genitais (36). A figura 3 ilustra os grandes géneros.

Figura 3. Classificação HPV. Adaptado de Doorba J. (2006) (36).



1.2.3 - Relação com o desenvolvimento de neoplasias

As neoplasias representam atualmente a primeira causa de morte entre adultos nos países desenvolvidos. Como consequência deste fato, um grande número de estudos procura elucidar quais são os fatores predisponentes e como estes interagem com o DNA para ocasionarem câncers.

Estudos epidemiológicos têm relacionado de forma consistente o HPV com o carcinoma do colo de útero, da orofaringe e do canal anal.

A relação HPV e carcinoma do colo de útero representa um dos capítulos mais bem estudados da carcinogênese viral, com dados epidemiológicos e modelos teóricos apontando para uma relação causal. Em 1995, a *International Agency for Research on Cancer* (IARC), concluiu que os dados da literatura eram suficientes para classificar os HPV 16 e 18 como agentes carcinogênicos para a espécie humana.

Os dados mais relevantes foram produzidos por um conjunto de 13 estudos de caso controlo, multicêntricos, desenvolvidos na Espanha, Colômbia, Brasil, Paraguai, Peru, Marrocos, Argélia, Tailândia, Filipinas e Índia. Nestes estudos foram incluídas 2000 mulheres com neoplasia e 2000 mulheres sem neoplasia (controles) e foi utilizada uma técnica de PCR de primeira geração para detetar a presença de DNA de HPV nas amostras tumorais. A análise dos dados demonstrou uma razão de probabilidade (*odds ratio*) para a associação entre a identificação de DNA de HPV e a presença de carcinoma, variando entre 17 e 156, respetivamente na Espanha e nas Filipinas. Os tipos 16 e 18 tiveram as maiores razões de probabilidade entre todos os tipos avaliados. A associação era igualmente significativa para carcinoma escamocelular e adenocarcioma. Os dados atuais também permitem classificar os tipos 31, 33, 35, 45, 51, 52, 58 e 59 como carcinogénicos (38). A relação do HPV com o carcinoma do colo de útero foi reforçada por um estudo efetuado em 22 países que avaliou a presença de material genético de HPV em 1000 biópsias de neoplasias do colo de útero, inicialmente utilizando a reação em cadeia da polimerase com *primers* de primeira geração, tendo sido detetada a presença de HPV em 93% dos casos. Após esta análise inicial, as biópsias negativas foram novamente testadas utilizando *primers* mais sensíveis e específicos e foi detetado DNA viral em 99,7% das amostras (39). Um facto interessante é a existência de várias mulheres infetadas por este vírus que não desenvolveram neoplasia, demonstrando que outros fatores como o estímulo estrogénico, a presença de infeção por clamídia, deficiências nutricionais e fatores imunes poderão estar envolvidos como cofatores (39).

A relação entre HPV e carcinoma da orofaringe tem sido estudada mais intensamente nos últimos 30 anos com estudos epidemiológicos da década de 90 mostrando que até 50% das neoplasias da orofaringe podem ser atribuídas ao HPV (40). Os estudos que utilizaram a técnica de PCR têm demonstrado que o HPV tipo 16 corresponde a 80% dos casos relacionados com HPV (41).

O estudo denominado *International Collaboration on Oropharyngeal Cancer Network for Staging* (ICON-S) analisou 1907 pacientes com carcinoma da orofaringe em que se detetou DNA de HPV e 696 doentes em que este não foi identificado. A sua conclusão foi que os indivíduos com HPV são de idade mais jovem, apresentam menor incidência de tabagismo e etilismo, pertencem na sua maioria ao sexo masculino, apresentam tumores agressivos com envolvimento precoce dos gânglios linfáticos, mas apresentam de forma global melhor prognóstico. A relevância destes dados é tão grande que atualmente se recomenda a pesquisa de HPV 16 por imunohistoquímica nas amostras tumorais (42).

Outro carcinoma com relação direta com o HPV é a neoplasia de canal anal. Uma meta-análise publicada em 2009 concluiu que o HPV pode ser detetado em 84 % dos carcinomas escamocelulares do ânus, sendo o HPV-16 encontrado na maioria dos casos (43).

1.2.4 Relação com cancro colo-retal

Tendo como base os dados que demonstram clara correlação causal entre o HPV e o carcinoma do colo de útero foi levantada a hipótese de que o HPV também pode ter relação com a neoplasia colo-retal.

Os primeiros estudos que avaliaram a relação entre o HPV e o cancro colo-retal datam de 1990. Kirgan e colaboradores testaram a presença de antígenos de HPV por estudo imunohistoquímico em amostras de material histológico parafinados. De entre as 30 amostras provenientes de tumores intestinais, a presença de antígenos de HPV foi observada em 29, ou seja, em 97% das amostras testadas. Neste mesmo estudo analisaram comparativamente a presença de material de HPV de biópsias de tecido normal do cólon e os mesmos antígenos foram apenas detetados em 23%. Desta forma, quando se comparou a presença de HPV entre as amostras tumorais e as amostras de tecido do cólon normal foi observada uma diferença estatisticamente significativa (44).

Em 1992 foi publicado o estudo de Shah e colaboradores. Neste estudo foi investigada a presença de HPV 16 e 18, utilizando a técnica de PCR em 50 peças de tumores colo-retais, não tendo sido detetado DNA de HPV em nenhuma das amostras (45). Posteriormente, vários estudos com metodologia de pesquisa diferentes tentaram perceber se existe uma clara correlação causal entre o HPV e o carcinoma colo-retal.

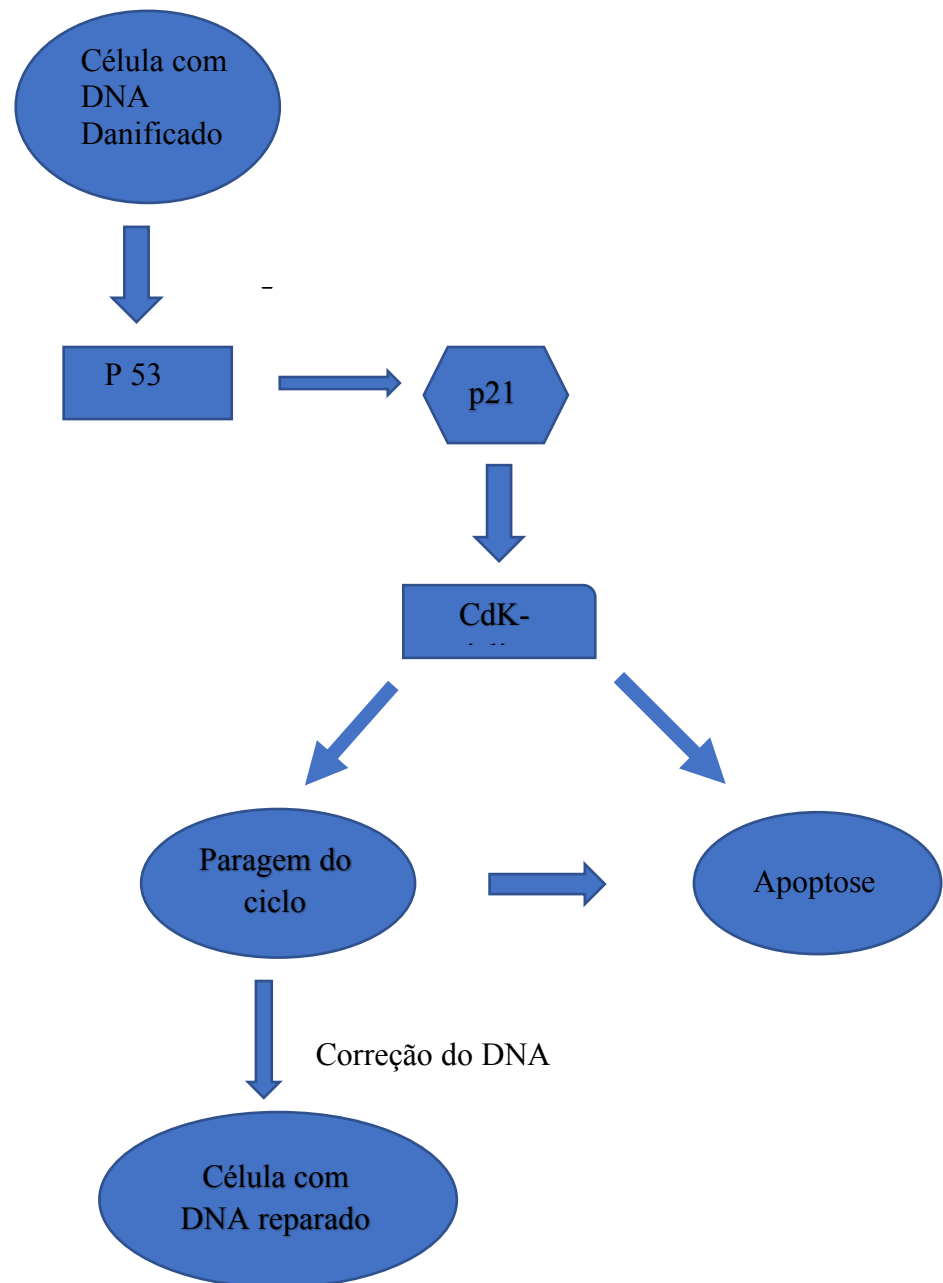
1.2.5 - Aspectos moleculares da fisiopatogenia

A relação causal entre o HPV e o carcinoma do colo do útero é bem estabelecida do ponto de vista epidemiológico há pelo menos duas décadas. Nos últimos anos, vários estudos foram publicados demonstrando, a nível molecular, o modo como o HPV de alto risco interage com o DNA humano ocasionando neoplasias.

Estão envolvidos diretamente no processo de carcinogénese 4 genes, sendo dois virais, o E6 e o E7, e dois supressores de tumores humanos, o p53 e o do retinoblastoma humano (RB).

O p53 é um gene supressor de tumor, conhecido como “guardião do DNA”, dada a sua importância na manutenção da integridade deste. Em células normais, a proteína p53 regula negativamente o crescimento celular, controlando a transição entre as fases G0/G1 (Figura 4). Em caso de deterioração do DNA, a proteína p53 tem a capacidade de parar o ciclo celular.

Figura 4. Via fisiológica do gene P53. Adaptado de Munger K. (1989) (46).



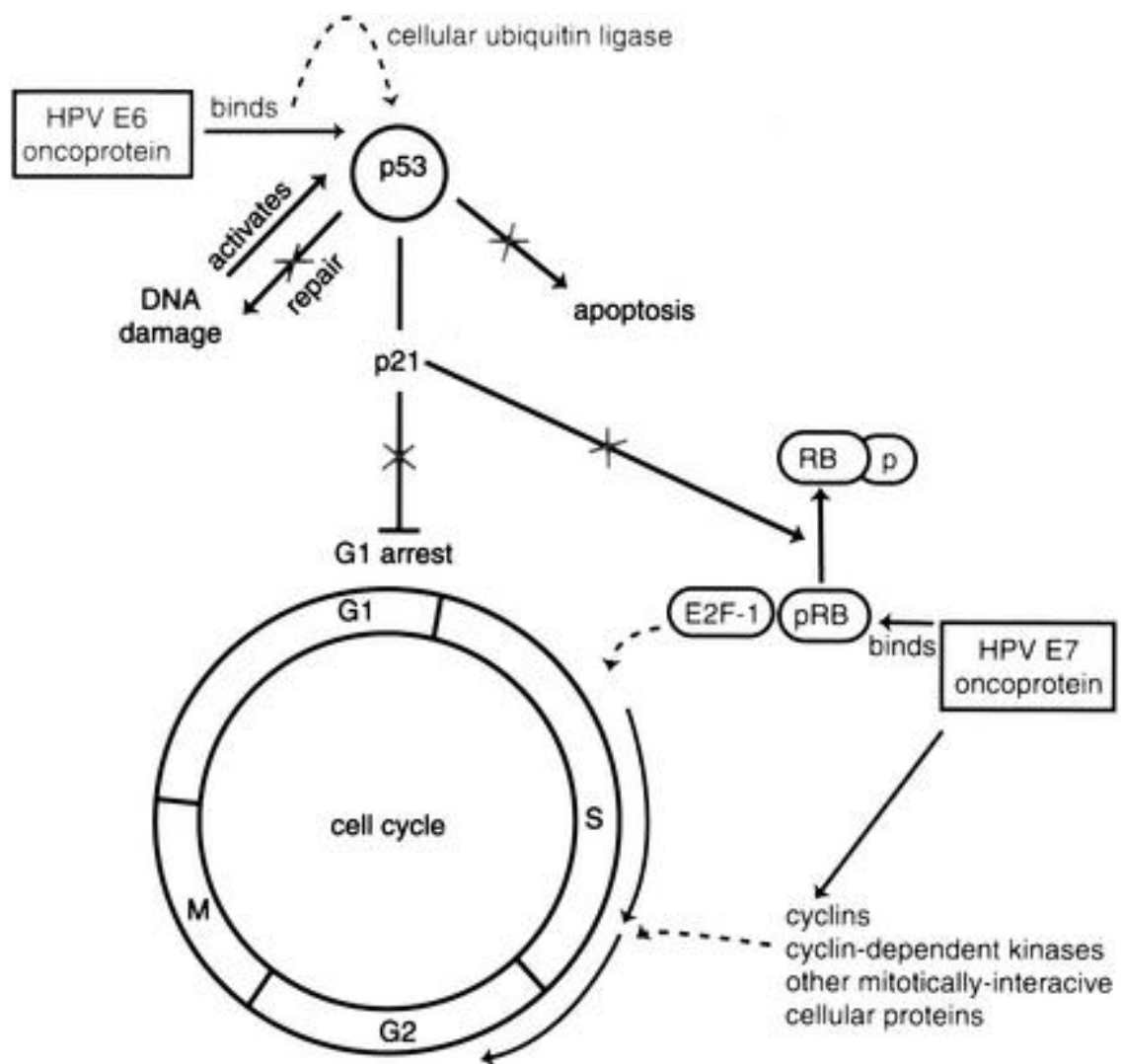
O gene viral E6 codifica uma proteína de 158 aminoácidos, chamada proteína E6. Esta tem a capacidade de estimular a proliferação celular ao degradar o produto do gene p53, via a degradação dependente de ubiquitina. Em células infectadas pelo HPV de alto risco, a degradação da proteína p53 prejudica um ponto de controlo celular extremamente importante, permitindo que ocorra divisão celular, mesmo com a presença de inúmeras alterações do DNA (46).

O gene E7 também tem um papel importante na desregulação das células infectadas. A proteína E7 liga-se ao gene do retinoblastoma (gene Rb) numa região essencial para a função de controlo celular conhecida como “*pocket domains*”. O gene do retinoblastoma é considerado um gene supressor de tumor. Quando a sua ação está preservada, ele produz a proteína do retinoblastoma (pRB), que tem por função manter o ciclo celular quiescente através de sua ligação com o fator de transcrição E2F na fase G1 e subsequentemente inibição de enzimas relacionadas com a proliferação celular. A proteína E7 ocasiona a quebra da ligação entre o pRB e o fator de transcrição E2F e liberta a forma ativada do E2F, que em última análise promove a síntese de DNA não programada biologicamente (figura 5) (47).

A interação das duas proteínas virais com os 2 genes supressores citados anteriormente ocasiona uma instabilidade genómica e uma posterior imortalização celular.

Apesar deste mecanismo estar bem descrito na fisiopatogenia dos tumores do colo de útero, até à presente data não foi descrito para os adenocarcinomas colo-retais.

Figura 5 . Relação entre as proteínas E6 e E7 e os genes RB e P53 - adaptado de Baldwin A. (2008) (47).



2.0 Justificação do estudo

Tendo por base os resultados controversos da literatura quanto à potencial relação entre o HPV e o desenvolvimento do carcinoma colo-retal e considerando a alta prevalência do HPV na América Latina e em especial no Brasil, decidimos realizar um estudo retrospectivo, utilizando a população do sudoeste do Estado da Bahia para analisar a presença de HPV 16 e 18 em amostras de tumores do cólon e do reto.

Como mencionado anteriormente, dados recentes têm demonstrado uma incidência elevada e crescente da neoplasia do cólon e sobretudo do reto na população abaixo dos 50 anos, sem uma explicação clara na literatura. Este fato, associado à inexistência de um trabalho que analise apenas doentes jovens motivou-nos a escolher a população alvo para o nosso estudo, a de indivíduos com menos de 50 anos na altura do diagnóstico.

A definição da correlação causal entre o HPV e a carcinogénese colo-retal pode mudar radicalmente a compreensão da biologia desta neoplasia, abrindo campo para pesquisa de novos medicamentos e novos métodos de diagnóstico mais sensíveis e menos invasivos. Outro ponto extremamente relevante é a possibilidade da utilização da vacina contra o HPV. Atualmente, a administração da vacina contra o HPV em adolescentes já é uma realidade no Brasil e noutros países com o intuito de prevenir o carcinoma do colo de útero. Caso uma correlação com o cancro colo-retal possa ser futuramente demonstrada, a vacina contra HPV poderá ser utilizada na população adulta para redução dos tumores do intestino.

3.0 Objetivos

3.1 Objetivos Gerais

- Avaliar a presença de fragmentos de DNA de HPV 16 e 18 em amostras de tumores de cólon e reto por técnica de PCR em doentes com menos de 50 anos na altura do diagnóstico e sem história familiar de neoplasia hereditária

3.2 - Objetivos Específicos

1. Correlacionar a presença de material genético de HPV com:
 - Idade na altura do diagnóstico
 - Sexo
 - Grau histológico do tumor
 - Localização do tumor
 - Classificação por estádios ou categorias

2. Analisar a relação entre o tempo de conservação em parafina e a viabilidade das amostras para deteção de DNA de HPV

4.0 População, materiais e métodos

4.1 Tipo de estudo

Esta investigação é um estudo retrospectivo transversal

4.2 População estudada

O presente estudo foi efetuado com doentes atendidos no serviço de oncologia do Hospital Geral de Vitória da Conquista, cujos dados foram catalogados digitalmente. A seleção incluiu doentes com diagnóstico comprovado por estudo anatomopatológico, de carcinoma colo-retal, com amostras colhidas e registadas em um laboratório de anatomia patológica da supracitada cidade, com idade à época do diagnóstico até os 50 anos e sem história familiar de neoplasia colo-retal.

4.3 Critérios de inclusão

1. Diagnóstico de tumor do colon ou reto
2. Idade menor do que 50 anos na altura do diagnóstico
3. Ficha digital disponível no serviço de oncologia
4. Material de tumor armazenado

4.4 Critérios de exclusão

1. Doentes cujo material registado no laboratório de anatomia patológica já não se encontrava disponível e apropriadamente armazenado, de acordo com os critérios de armazenamento do referido laboratório
2. Doentes dos quais não se obteve autorização para o uso do material registado no laboratório, através da assinatura do termo de consentimento livre e informado, por parte do doente ou do familiar responsável adequadamente registado na unidade de Oncologia do Hospital Geral de Vitória da Conquista.

4.5 Metodologia de colheita de dados

A colheita de dados e de materiais foi feita em fases distintas e organizadas. A primeira fase foi de inclusão, com a seleção de 44 doentes, a partir do cruzamento de dados entre o serviço de oncologia e de patologia, os quais preenchiam os critérios de inclusão da pesquisa.

A segunda fase foi de procura e convite aos indivíduos selecionados, através de contato telefónico previamente registado na unidade de saúde, para posterior encontro com os pesquisadores na clínica oncológica, com o objetivo de os próprios e/ou os seus familiares responsáveis serem informados sobre os objetivos e a metodologia da investigação. Posteriormente foi-lhes oferecida a oportunidade de esclarecimento, de tirar dúvidas e de autorizarem ou não a sua inclusão no estudo, através de assinatura do termo de consentimento livre e informado, sendo uma cópia entregue ao doente ou seu familiar.

Nesta fase foram excluídos 22 indivíduos, de entre os que não se conseguiram contactar através do contato telefónico (20) ou que não quiseram ser incluídos neste projeto (2).

A terceira fase foi a de confirmação de armazenamento adequado, no serviço de patologia, dos blocos de parafina enumerados especificamente contendo o tumor primário, correspondentes aos doentes que foram submetidos a cirurgia parcial ou total, bem como os blocos de fragmentos dos que tinham apenas sido submetidos a biópsia. Nesta fase foram excluídos três participantes, cujas peças tinham sido transferidas para outro laboratório e, como consequência, não se encontravam disponíveis. Neste período foram separados, ainda no armazenamento, os materiais que seriam enviados para um serviço de referência.

Posteriormente efetuou-se colheita, no serviço de oncologia, das variáveis dos 19 indivíduos incluídos no estudo, de acordo com o objetivo dos investigadores: idade no momento do diagnóstico, sexo, grau tumoral e localização do tumor, estádios clínico e patológico. Os dados foram colhidos em fichas físicas e duplamente revistas, digitalizados, validados e analisados.

O computador utilizado para inserção, validação e análise dos dados foi protegido por uma senha possuída apenas pelos responsáveis pela investigação e as cópias assinadas dos termos de consentimento livre e informado. As fichas físicas utilizadas para a colheita dos dados foram arquivadas em armários fechados, sendo os mesmos investigadores responsáveis pelas chaves. Semanalmente, foi realizado uma cópia de segurança dos bancos de dados com o objetivo de prevenir a perda das informações registadas.

4.6 Metodologia de armazenamento e envio

Todas as 19 amostras tumorais foram devidamente catalogadas e embaladas individualmente para evitar contaminação. O tempo de conservação do material no laboratório de anatomia patológica variou de 4 a 70 meses, sendo que durante todo o armazenamento a temperatura permaneceu entre os 8 e os 22°C. Uma empresa especializada em transporte de material biológico foi contratada posteriormente.

Durante o transporte as amostras não foram submetidas a variações importantes de temperatura (a temperatura foi mantida de 8 a 22 graus), exposição a humidade ou qualquer fator que pudesse levar a degradação do material. Como o estudo foi retrospectivo, obteve-se todo o material biológico já processado em lâminas e blocos. O processamento deste material seguiu o protocolo rígido do laboratório de anatomia patológica, mas não específico para pesquisa de DNA.

4.7 Metodologia de análise por técnica de PCR

As amostras tumorais dos doentes selecionados foram encaminhadas para um serviço especializado e certificado para a realização da pesquisa de DNA viral de HPV 16 e 18 por método de técnica de PCR multiplex.

As amostras biológicas foram inicialmente revistas por uma patologista, que confirmou a presença do tumor e escolheu a área mais representativa, tendo por critério o maior número de células tumorais. Posteriormente foi realizada a extração de DNA, segundo Stefanoff et al (48). Para a digestão enzimática utilizou-se o método com proteinase K e realizou-se o corte manual da área delimitada, retirando-se o excesso de parafina. O mesmo foi inserido num tubo de 1,5 mL contendo 50 µL de tampão TET (TRIS-Cl 10 mM, EDTA 10 mM e Tween 20 - 0,5%) e 10 µL de proteinase K a 20 mg/mL-1 e incubado em banho seco durante 12 horas. Em seguida, a proteinase K foi inativada durante 15 minutos a 94°C. Após a sua inativação, adicionou-se 1 ml de fenol saturado (Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA) e fenol tamponado (pH = 8.0) e os tubos foram centrifugados a 4.200 xg durante 20 minutos. O sobrenadante foi então transferido para outro tubo, tendo sido acrescentado 1 ml de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (25:24:1), homogeneizado e centrifugado a 4.200 xg durante 20 minutos.

O sobrenadante foi novamente transferido para outro tubo de 1,5 ml. Para a precipitação do DNA genómico foram adicionados 2 a 3 volumes de etanol absoluto e 1/10 do volume de acetato de amónio 7 M (Sigma, St. Louis, EUA), tendo a mistura permanecido assim durante a noite. O tubo foi posteriormente centrifugado a 19.600 xg durante 20 minutos e o precipitado de DNA lavado com etanol a 70%. Após a evaporação do etanol à temperatura ambiente, o precipitado foi dissolvido em 30-50 µl de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7.4 e EDTA 1 mM, pH 8.0) e mantido a 4°C até à sua quantificação.

De seguida foram realizadas a quantificação e a amplificação do DNA. A quantidade e pureza do DNA genómico obtidos foram determinadas por densidade óptica em espectrofotómetro (DU-640, Beckman, Palo Alto, CA, EUA) para identificação da quantidade de DNA em µg/µl e submetida a técnica de PCR para controle do tamanho do material extraído, uma vez que os ensaios moleculares baseados em técnicas de PCR dependem da integridade do DNA. Os segmentos de 100, 200, 300, 400 e 600 bp dos genes humanos da sintase do tromboxano, ativador de recombinação, dedo-de-zinco da leucemia promielocítica e dois éxons do gene AF4, respetivamente, foram amplificados para controle da viabilidade, de acordo com o protocolo descrito por Van Dongen (49).

Para deteção dos subtipos de HPV utilizaram-se iniciadores dirigidos a segmentos específicos do genoma dos subtipos 16 e 18 (VdB16.S: TGC TAG TGC TTA TGC AGC CAA e VdB16.A: ATT TAC TGC AAC ATT GGT AC) e 18 (VdB18.S: AAGGAT GCT GCA CCH GTC TGA e VdB18.A: CAC GCA CAC GTC TGG CAG GT) (SOLER et.al.,1991), que amplificam fragmentos de 152 e 216 pares de base, respetivamente. A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 25 µL, sendo constituída por 1,4X tampão para técnica de PCR (Tris-HCl 100 mM/KCl 500 mM), 3,0 mM de Cloreto de Magnésio, 0,2 de mM dNTPs, 0,3 µM cada iniciador (Sl6-11.S/Sl6-11A, VdB16.S/VdB16.A, VdB18.S/VdB18.A) e 1,25U deTaq DNA polimerase. Para cada reação de amplificação foram utilizados 2 µL (0,1µg/µL) da solução contendo o DNA

extraído anteriormente. Em cada bateria de amplificação pela técnica de PCR, utilizou-se sempre um controle negativo, constituído pelas mesmas concentrações e pelos mesmos reagentes da reação de amplificação, exceto o DNA e os controlos positivos de DNA para cada tipo de HPV pesquisado (DNA 6,11, 16 e 18). A reação de amplificação do DNA foi realizada em tubos de 500 µL, incubados no termociclador (MJ Research PTC 150) com as seguintes condições de ciclagem: 94oC - 5 min. (1X), 94oC - 1 min., 55oC - 1 min., 72oC - 1 min. (40X), 72oC - 7 min. (1X). Após a amplificação, foram utilizados 10 µL do produto da PCR de cada amostra somados com 2 µL de *loading buffer* (0,25% de azul de bromofenol, 15% de Ficoll tipo 400). O volume final foi aplicado em gel depoliacrilamida a 7% e submetido à corrida eletroforética em cuba vertical a 250 V durante 50 minutos. O gel foi corado com nitrato de prata e a distinção dos tipos de HPV foi realizada por comparação das bandas geradas no gel com os controlos positivos de cada subtipo.

4.8 Critérios para classificação

Os doentes foram avaliados e classificados utilizando tabelas mundialmente padronizadas e reprodutíveis para este problema.

4.8.1 Grau nuclear

As peças biológicas foram submetidas a estudo anatomopatológico e os tumores foram classificados quanto ao grau nuclear, conforme a figura 6.

Figura 6. Classificação quanto ao grau nuclear

Grau 1	Bem diferenciado
Grau 2	Moderadamente diferenciado
Grau 3	Pouco diferenciado

4.8.2 Estádio tumoral

Todos os doentes tiveram a sua peça cirúrgica avaliada por estudo anatomopatológico e foram submetidos a tomografia do tórax e do abdome. A partir destas informações o estágio do tumor foi definido utilizando o modelo tumor, nódulo, metástase (TNM), segundo a 7ª edição do American Joint Committee on Cancer (AJCC) (50) e conforme a figura 7 .

Figura 7. Classificação TNM

Tumor

Tx	Tumor primário não pode ser avaliado
To	Sem evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma “in situ”
T1	Invasão da submucosa
T2	Invasão da muscular própria
T3	Invasão da serosa
T4	Invasão de outros órgãos ou estruturas

Nódulo

N0	Ausência de invasão dos gânglios linfáticos
N1	Metástase em 1 a 3 gânglio(s) linfático(s) regional (is)
N2	Metástase em 4 ou mais gânglios linfáticos regionais

Metástase

Mx	Metástases à distância não podem ser avaliadas
M0	Ausência de metástases à distância
M1	Presença de metástases à distância

Agrupamento

Estádio 0	TisN0Mo
Estádio 1	T1 ou T2 N0 M0
Estádio 2	T3-4 N0 MO
Estádio 3	Qualquer T, N1 ou N2, Mo
Estádio 4	Qualquer T ou N com M1

4.8.3 Localização do tumor

Todos os doentes tiveram a localização do tumor definida a partir dos resultados da colonoscopia ou a partir dos resultados cirúrgicos (em casos de indivíduos operados com caráter de urgência sem colonoscopia), conforme figura 8.

Figura 8. Classificação quanto à localização do tumor

Cólon proximal	Inclui o intestino cego, o cólon ascendente e o transversos
Cólon distal	Inclui o cólon descendente e o sigmoide
Reto	Inclui tumores até 12 cm da borda anal

5.0 Resultados

5.1 Características demográficas

Dos 39 doentes que preenchiam o critério de idade e possuíam amostras disponíveis, apenas 19 assinaram o termo de consentimento informado e foram estudados. Destes, sete (36%) eram portadores de tumores de reto e 12 (64%) de tumores do cólon.

A média de idade de todos os doentes foi de 41,8 anos. A média para os indivíduos portadores de tumor de reto foi de 42,7 anos e para aqueles em que se diagnosticou tumor do cólon foi de 41,9 anos.

Dos 19 doentes, 12 (64%) eram homens e sete (36%) eram mulheres.

5.2 Características Clínico Patológicas

Como citado anteriormente, sete doentes (36,84%) eram portadores de tumor de reto e 12 (63,16%) de tumores de cólon. Quando se subdividiu em cólon proximal (incluindo cego, cólon ascendente e transversal) e cólon distal (incluindo descendente) observamos que 7 doentes (36,84% do total) apresentaram tumores distais e 5 doentes (26,32%) tumores proximais do cólon, conforme a figura 9.

Figura 9. Localização dos Tumores

	Localização do Tumor	Número de doentes
	Cólon proximal	5 doentes (26,32%)
	Cólon distal	7 doentes (36,84%)
	Reto	7 doentes (36,84%)
Total		19 doentes (100%)

A classificação dos tumores segundo o sistema internacional TNM está descrita na figura 10. Observa-se que a maioria dos doentes está no estágio III.

Figura 10. Classificação do estágio tumoral, segundo TNM AJCC 7ª edição (50)

	Estádio	Número de doentes
	I	00 doentes (0%)
	II	05 doentes (26,32%)
	III	10 doentes (52,63%)
	IV	04 doentes (21,05%)
Total		19 doentes (100%)

Outra variável abordada foi o grau histológico, de acordo com a figura 11, a maioria dos casos foi classificada como grau II.

Figura 11. Grau histológico

	Grau histológico	Doentes
	Grau I	08 (42,10 %)
	Grau II	11 (57,89 %)
	Grau III	00 (0%)
Total		19 (100%)

5.3 Pesquisa de HPV

Os 19 doentes tiveram o seu material histológico, proveniente de biópsias tumorais, analisados por técnica de PCR para deteção de DNA de HPV 16 e 18. O teste foi inconclusivo por ausência de DNA em qualidade e quantidade satisfatórios em três doentes. Os 16 doentes restantes apresentaram DNA em quantidade e qualidade satisfatória, conforme descrito na figura 12.

Figura 12. Presença de DNA satisfatório nas amostras

Doentes	DNA
3 doentes	DNA insatisfatório para análise
16 doentes	DNA satisfatório para análise

Os três doentes que apresentaram DNA insatisfatório para análise apresentavam tumores de reto. Em todas as amostras provenientes do cólon foi possível detetar DNA viável. Estes dados são apresentados na figura 13.

Figura 13. Viabilidade do DNA

Local do tumor	DNA satisfatório	DNA insatisfatório	Percentagem de material insatisfatório
Cólon proximal	5	0	0 %
Cólon distal	7	0	0 %
Reto	7	3	42,85%

Os 16 doentes que apresentaram DNA satisfatório foram testados por técnica de PCR para HPV utilizando “*primers*” altamente sensíveis do segmento conservado de 140-150 pb da região L1, que permitem o diagnóstico de uma ampla gama de subtipos conhecidos de HPV e posteriormente foram testados para segmentos específicos da região L1 dos subtipos 16 e 18. Não foi possível identificar a presença de DNA de HPV em nenhuma das amostras testadas (figura 14)

Figura 14. Presença de DNA de HPV nas amostras analisadas

Sequência testada	Positivos	Negativos
Segmento de L1 comum a vários HPV's	0	16
Segmento L1 de HPV 16	0	16
Segmento L1 de HPV 18	0	16

Como mencionado anteriormente, três das 19 amostras estudadas não apresentaram DNA viável e desta forma não foram analisadas quanto à presença de DNA de HPV. As amostras foram todas submetidas a processo de fixação, parafinização e armazenamento semelhantes, ou seja, todas foram fixadas em formol tamponado a 10%, posteriormente parafinados e armazenados no mesmo ambiente e com condições de temperatura idênticas. Com o objetivo de saber se o tempo de conservação foi relevante para a degradação do DNA, dividimos as amostras em três grupos, de acordo com o seu tempo de conservação.

Grupo A - até 2 anos da análise

Grupo B - de 2 a 5 anos da análise

Grupo C - há mais de 5 anos da análise

A figura 15 mostra a localização de amostras com DNA inviável de acordo com o tempo de conservação.

Figura 15. Localização de amostras com DNA inviável

	Número total de amostras	Número de amostras com DNA inviável	Porcentagem de amostras inviáveis
Grupo A	9 (47,36%)	1	11%
Grupo B	8 (42,11%)	1	12,5%
Grupo C	2 (10,53%)	1	50%
Total	19 (100%)	3	-

Os dados apresentados acima demonstram que as amostras com mais de 5 anos de conservação não apresentavam DNA íntegro em metade dos casos.

6.0 Discussão

Nos últimos anos tem-se observado de forma clara um aumento da incidência de cancro do cólon e sobretudo do reto em indivíduos abaixo de 50 anos. O estudo publicado recentemente por Siegel (51) no *Journal of Cancer Institute* descreveu, de forma clara, esta mudança de epidemiologia. No referido estudo, efetuado retrospectivamente, foram analisados 490 mil casos do SEER (*Surveillance, Epidemiology, and End Results*), de 1974 a 2013. Entre 1980 a 2013 foi observado um aumento de 2,4% por ano na incidência do cancro de cólon nos adultos entre os 20 -29 anos e um aumento de 1,0% ao ano em adultos dos 30-39 anos. Este mesmo comportamento também foi observado em doentes com cancro de reto: no grupo etário entre os 20 e 29 anos observou-se um aumento da incidência de 3,2% ao ano e no de 30 a 39 anos um aumento de 2,3% no mesmo período de tempo. Quando se analisa o mesmo banco de dados do SEER observa-se que, entre 1989 a 1990, os casos de cancro de reto abaixo de 55 anos representavam 15% de total de casos, enquanto que de 2012 a 2013 o mesmo grupo etário apresentou quase 30% dos casos. Assim, atualmente cerca de três em cada 10 casos de carcinoma do reto são diagnosticados em doentes abaixo de 55 anos nos Estados Unidos da América (51). Este fenómeno não está restrito nos Estados Unidos da América. Um estudo publicado por S. Gupta e cols. e realizado na Índia demonstrou uma elevada incidência de cancro colo-retal em indivíduos abaixo de 50 anos. Neste estudo foi observada uma proporção entre doentes com CCR abaixo dos 40 anos versus pacientes com CCR acima dos 40 anos de 0.64, sendo que este número é muito superior à média internacional de 0,07 (6). Outros estudos de várias partes do mundo sugerem resultados semelhantes. Por exemplo, estudos de prevalência demonstram que é elevada entre os jovens no Egito, 38% (52), na Turquia, 18% (53), no Nepal 29% (8), na Arábia Saudita, 23% (54) e em Taiwan, 10,1% (55).

Tendo por base o que foi exposto acima, fica claro o aumento da incidência de tumores colo-retal em doentes jovens em várias regiões do mundo. Porém, a etiologia deste fenómeno ainda permanece controversa.

A partir da década de 90 surgiram vários estudos avaliando a correlação entre o HPV e o carcinoma colo-retal em partes diferentes do mundo com populações alvo e métodos de pesquisa e resultado diferentes (17, 45, 56-62)

Tanto quanto é do nosso conhecimento, o presente estudo é o primeiro efetuado no Brasil que investiga a relação entre HPV e o carcinoma colo-retal no subgrupo de doentes abaixo de 50 anos e sem história familiar de cancro.

Quando comparamos as características patológicas dos tumores CCR em doentes menores de 50 anos com os mais velhos observamos diferenças claras em relação ao estágio inicial, ao grau tumoral e a outras características como a presença de células em anel de sinete. No estudo de O'Connell, publicado em 2004, que analisou mais de 47 mil casos do banco de dados do SEER e comparou doentes acima e abaixo de 40 anos foi observado que os doentes mais jovens apresentavam tumores mais avançados com predomínio de estágio III e IV, mais indiferenciados e uma elevada incidência de tumores com células em anel de sinete (3,8 x 0,8 % com $p < 0,001$) (63).

No nosso estudo com foco em doentes abaixo de 50 anos, observamos um predomínio do sexo masculino (64%). A maior parte dos doentes foi classificada como estágio III e IV (73,68 %). Em relação à localização primária foram mais frequentes os tumores do reto (36,84%) e quanto ao grau tumoral a grande maioria dos tumores apresentaram grau intermédio (52,63 %). Os nossos dados são muito semelhantes ao estudo de Dozois et al (64). No referido estudo foram analisados de forma retrospectiva 1025 doentes, abaixo de 50 anos, sem história familiar de cancro, de uma única instituição, entre 1976 a 2002. Um predomínio de indivíduos do sexo masculino foi observado, os estádios III e IV representaram 66% dos casos, a localização mais habitual foi o reto (49,1%) e o grau predominante foi o grau II (54%).

A presença de DNA de HPV dos subtipos 16 e 18 foi pesquisada em 19 amostras de tumores colo-retais, sendo que em três amostras ocorreu degradação do material genético, não sendo possível identificar material genético viável. Nas 16 amostras restantes, o material genético estava preservado, a técnica de PCR para pesquisa de DNA de HPV foi efetuada, sendo todas as amostras negativas. Desta forma, não foi observada nenhuma relação entre o HPV e o carcinoma colo-retal.

Estes dados estão em concordância com vários estudos publicados previamente.

No estudo publicado por Gornick et al em 2010 foram avaliadas 279 amostras de tumores colo-retais (blocos de parafina em sua maioria) provenientes de Israel, Espanha e Estados Unidos da América utilizando a técnica de PCR, no qual se pesquisaram 32 subtipos de HPV. Não foi identificado DNA de HPV em nenhuma amostra para nenhum dos tipos de HPV testados. Da análise estatística deste conclui-se que a prevalência de infecção pelo HPV em tumores de cólon é menor do que 2% ($p=0,03$) (59).

Em outro estudo conduzido por Yavuzer et al em Istambul (2011) foram analisadas 102 amostras de carcinomas colo-retais e 62 amostras de adenoma por técnica de PCR para pesquisa de HPV, tendo-se utilizado como controlo 49 fragmentos de tumores de colo do útero. Neste estudo não foi detectado DNA de HPV em nenhum carcinoma ou adenoma colo-retal (57).

Snietura M. et al analisaram a presença de 14 subtipos de HPV de alto risco, utilizando a técnica de Real Time PCR, em 50 amostras parafinadas de carcinomas colo-retais e adenomas. Não foi observada presença de DNA de HPV em nenhuma das amostras. Os autores concluíram que se existir uma contribuição do HPV na patogénese dos tumores colo-retais, não será um papel dominante (17).

O estudo de maior dimensão existente na literatura que testou a correlação entre o HPV e os tumores colo-retais foi publicado em 2013 por Burnett e al, no qual foram incluídos 555 doentes com CCR diagnosticados entre 1998 e 2002. O material genético de HPV 16 e 18 foi pesquisado utilizando a técnica de *real-time* PCR. A deteção de DNA de HPV foi extremamente baixa, tendo sido identificado DNA de HPV subtipo 16 em 2% das amostras do cólon, mas não do subtipo 18 de HPV.

Diante da hipótese de que a infecção pelo HPV tem potencial de acelerar a carcinogénese e ocasionar CCR em doentes jovens foi avaliado se os indivíduos com infecção por HPV eram mais jovens do que os sem infecção por HPV. No estudo não foi encontrada diferença etária entre os dois grupos HPV analisados, sugerindo que se o HPV faz parte da carcinogénese ele não ocasiona cancro mais precoce (61).

Além dos estudos acima podem ainda citar-se os trabalhos de Taherian H et al, F Gazzaz F et al, Koulos J et al, Boquszakova L e al que mostram resultados semelhantes aos anteriores, ou seja, ausência de material genético de HPV nas amostras de adenocarcinomas (58, 60, 65, 66).

Em oposição aos dados citados anteriormente, algumas publicações mostram elevada incidência de HPV nas amostras de tumores colo-retais. Em 2013, Damin D e al. publicaram um meta-análise sobre o tema HPV e CCR (67). Esta meta-análise incluiu 16 estudos publicados até julho de 2012, totalizando 1436 pacientes de 4 continentes (Europa, Ásia, América do Norte e América do Sul), na qual foi estipulado o critério de inclusão a pesquisa de HPV ter sido efetuada por técnica de PCR. A presença de HPV foi observada em 31,9% das amostras, com uma maior positividade na América do Sul 60,8% (95% CI:42.7-76,4) e predomínio da presença do subtipo 16. Apesar do mérito de agregar um grande número de doentes, essa meta-análise apresenta problemas metodológicos. O mais relevante é a grande heterogeneidade dos estudos incluídos.

Quando avaliamos uma meta-análise, o I^2 quadrado é um importante índice de heterogeneidade. Quando o I^2 é zero indica que todos os estudos são semelhantes, pelo que valores elevados permitem supor que os estudos são muito diferentes e não deveriam ser analisados em conjunto. Observamos que o I^2 foi 27,8% para a análise do risco relativo dos doentes com pesquisa positiva de DNA de HPV apresentarem CCR e de 75,6% para a análise do risco de infecção por HPV na amostra tumoral versus o risco de infecção em amostras de biópsia realizadas no intestino em área não tumoral (67).

Outra meta-análise de relevância foi publicada em 2014 por Baandrup e al. Neste estudo foram incluídos todas as publicações em inglês até 22 de março de 2013, utilizando não só técnicas de PCR como outras metodologias, num total de 37 artigos que analisaram 2630 doentes portadores de adenocarcinomas colo-retais. O HPV foi detetado em 11,2% das amostras (95% CI, 4,9-19,6), tendo sido também analisados em conjunto 8 estudos que possuíam um grupo controlo. Nestes estudos foram avaliadas as amostras de cancro e material de biópsias de cólon normal (controlo). A prevalência de HPV foi de 36,8% (95% CI, 21,3-53,8) em adenocarcinomas e 1,6% nos controlos (95% CI, 0,0-9,6%), tendo existido uma grande variação regional, com uma maior prevalência na Ásia e na América do Sul (62). Os autores justificaram este fato pela maior circulação destes vírus nestas partes do globo. Uma grande limitação da maioria dos estudos é a não utilização de métodos e procedimentos para evitar a contaminação das amostras durante a colheita, preparação do material, extração e amplificação do DNA. Como a metodologia de PCR é altamente sensível, discretos erros de protocolo podem gerar resultados falsos positivos. Um bom exemplo deste fato é que a maioria dos laboratórios de anatomia patológica utiliza a mesma lâmina do micrótomo para vários cortes, deste modo um único material positivo pode contaminar um grande número de amostras e pode alterar os resultados (61). Outro problema desta meta-análise foi a grande heterogeneidade entre os trabalhos, com I quadrado de 97,2% como comentado anteriormente, o que dificulta a interpretação e validação dos dados.

A maioria dos estudos sobre a prevalência de HPV em amostras de cancro colo-retal na América do Sul demonstrou elevadas taxas de deteção (68, 69). Estes dados são muito distintos dos observados no presente estudo.

Desta forma, é prudente analisar os aspetos metodológicos que possam contribuir para a baixa deteção, tais como a sensibilidade do método de deteção, o tipo de amostra utilizada e o tempo de conservação da mesma.

No presente estudo foi utilizada uma técnica de PCR multiplex, tendo a integridade inicial do DNA sido verificada com a pesquisa do gene da síntese de tromboxano. Nas amostras com DNA íntegro foi realizada a procura de sequências genéricas do segmento L1 e posteriormente utilização de *primers* específicos para os subtipos virais 16 e 18. O método utilizado, pesquisa de HPV por PCR multiplex, apresenta elevada sensibilidade (92 % para HPV 16 e 86% para HPV 18) e alta especificidade (96% para HPV 16 e 98% para HPV 18) (70-72). A metodologia do teste foi rigorosamente respeitada em todas as amostras e estas foram enviadas para um laboratório de referência nacional que segue protocolos rígidos. Desta forma, acredita-se que o teste utilizado foi adequado.

Uma outra hipótese possível para explicar a baixa detecção de HPV foi a utilização de amostras com material biológico conservado em parafina. Estudos iniciais sugerem que as amostras não parafinadas fornecem material de melhor qualidade e com maior sensibilidade. Porém, estudos recentes comparando a sensibilidade de técnicas de PCR em amostras parafinadas e não parafinadas tem demonstrado resultados semelhantes (73). Observamos que a grande parte dos estudos da literatura utilizou amostras parafinas, inclusive aqueles com elevada positividade para HPV. Desta forma, pensa-se que o uso de material parafinado não seja um fator que possa ter influência de forma relevante no resultado do estudo.

O tempo de conservação do material em parafina também pode ter influenciado o resultado, sobretudo quanto à viabilidade do material genético. Neste estudo foi observado que 50% das amostras conservadas durante mais de 5 anos apresentavam material genético degradado. No entanto, a literatura é escassa quanto a estudos que avaliem a relação entre o tempo de conservação em parafina e a viabilidade do material genético. Em uma revisão no pubmed encontrou-se apenas um artigo que mencionou que amostras conservadas por um período maior do que 5 anos apresentam menor probabilidade de amplificação do DNA (74).

Apesar de existirem na literatura estudos que demonstram a associação de HPV 16 e 18 com carcinomas colo-retais não se conseguiu estabelecer de forma clara e inequívoca uma relação causal. Quando se analisam os dados disponíveis utilizando os critérios propostos por Bradford e Hill (75) pode concluir-se que:

1. A força de associação pode ser parcialmente preenchida pois existem dados na literatura que demonstram um risco relativo aumentado, variando de 2,7- 9,1.
2. O critério consistência dos dados não pode ser preenchido, pois os dados são conflituosos, uma vez que os diversos estudos da literatura apresentam resultados muito distintos.
3. A especificidade não pode ser preenchida, pois não podemos afirmar claramente que a exposição a HPV pode causar carcinomas colo-retais.
4. A plausibilidade biológica pode ser preenchida, já que há dados que demonstram o potencial carcinogénico do HPV, mas existem várias lacunas não respondidas, como por exemplo o modo de acesso do HPV ao cólon.
5. O critério coerência não pode ser preenchido, pois os modelos de carcinogénese colo-retal vigentes não são consistentes com a carcinogénese do HPV.
6. O gradiente biológico não pode ser afirmado, devido à não existência de estudos que avaliem dose resposta HPV/cancro colo-retal.
7. A analogia pode ser afirmada porque existem dados da associação do HPV com o adenocarcinoma do colo do útero.
8. A temporabilidade não pode ser confirmada, devido à ausência de estudos prospetivos avaliando tal relação
9. O critério evidência experimental não pode atualmente ser preenchido, por inexistência de estudos que se debrucem sobre esta matéria (76).

7.0 Conclusões

Nos últimos anos tem ocorrido uma mudança drástica na epidemiologia do carcinoma colo-retal, com um aumento consistente da incidência em indivíduos abaixo dos 50 anos. Este aumento tem acontecido principalmente em tumores do reto. A causa para este fenómeno epidemiológico é desconhecida, mas uma hipótese plausível é a participação do vírus do papiloma humano na patogénese desta neoplasia. Em decorrência deste facto, conduziu-se um estudo para avaliar a presença de material genético de HPV 16 e 18 por técnica de PCR em amostras tumorais de indivíduos com menos de 50 anos e sem história familiar de CCR. No presente estudo todas as amostras com material genético viável foram negativas para DNA de HPV 16 e 18. Na literatura observamos uma grande diversidade de conclusões, com estudos que apresentam resultados semelhantes aos nossos e, pelo contrário, outros a demonstrarem um elevado índice de associação entre carcinoma colo-retal e HPV. Infelizmente, a maioria dos estudos que referiram esta situação apresentavam individualmente um número pequeno de casos e metodologias não adequadas. Do mesmo modo, as meta-análises derivadas destes estudos apresentaram grande heterogeneidade, dificultando a análise dos dados. Assim, com os dados atuais disponíveis na literatura e de acordo com este estudo, uma relação causal entre HPV e adenocarcinoma colo-retal não pode ser estabelecida. No entanto, para confirmar esta afirmação são ainda necessários estudos que utilizem metodologias corretas e com um maior número de doentes para responder a esta questão.

8. Referências

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(2):87-108.
2. Eddy DM. Screening for colorectal cancer. *Ann Intern Med*. 1990;113(5):373-84.
3. Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, et al. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology*. 1993;104(5):1535-49.
4. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*. 2016;66(1):7-30.
5. Davis DM, Marcet JE, Frattini JC, Prather AD, Mateka JJ, Nfonsam VN. Is it time to lower the recommended screening age for colorectal cancer? *J Am Coll Surg*. 2011;213(3):352-61.
6. Gupta S, Bhattacharya D, Acharya AN, Majumdar S, Ranjan P, Das S. Colorectal carcinoma in young adults: a retrospective study on Indian patients: 2000-2008. *Colorectal Dis*. 2010;12(10 Online):e182-9.
7. Shemesh-Bar L, Kundel Y, Idelevich E, Sulkes J, Sulkes A, Brenner B. Colorectal cancer in young patients in Israel: a distinct clinicopathological entity? *World J Surg*. 2010;34(11):2701-9.
8. Singh Y, Vaidya P, Hemandas AK, Singh KP, Khakurel M. Colorectal carcinoma in Nepalese young adults: presentation and outcome. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2002;29 Suppl 1:223-9.
9. Bhurgri Y, Khan T, Kayani N, Ahmad R, Usman A, Bhurgri A, et al. Incidence and current trends of colorectal malignancies in an unscreened, low risk Pakistan population. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011;12(3):703-8.
10. Goldvaser H, Purim O, Kundel Y, Shepshelovich D, Shochat T, Shemesh-Bar L, et al. Colorectal cancer in young patients: is it a distinct clinical entity? *Int J Clin Oncol*. 2016;21(4):684-95.

11. El-Tawil AM. Colorectal cancer and pollution. *World J Gastroenterol*. 2010;16(28):3475-7.
12. Lo AC, Soliman AS, Khaled HM, Aboelyazid A, Greenson JK. Lifestyle, occupational, and reproductive factors and risk of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2010;53(5):830-7.
13. Oddone E, Modonesi C, Gatta G. Occupational exposures and colorectal cancers: a quantitative overview of epidemiological evidence. *World J Gastroenterol*. 2014;20(35):12431-44.
14. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Viladiu P, Tormo J, Moreo P, et al. [Human papilloma virus in the etiology of cervicouterine cancer]. *Bol Oficina Sanit Panam*. 1993;115(4):301-9.
15. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999;189(1):12-9.
16. Salepci T, Yazici H, Dane F, Topuz E, Dalay N, Onat H, et al. Detection of human papillomavirus DNA by polymerase chain reaction and southern blot hybridization in colorectal cancer patients. *J BUON*. 2009;14(3):495-9.
17. Snietura M, Waniczek D, Nowakowska-Zajdel E, Piglowski W, Kopec A, Muc-Wierzgon M. Does human papilloma virus participate in colorectal carcinogenesis? *J Biol Regul Homeost Agents*. 2012;26(4):757-62.
18. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(2):69-90.
19. Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E. Worldwide variations in colorectal cancer. *CA Cancer J Clin*. 2009;59(6):366-78.
20. Wennstrom J, Pierce ER, McKusick VA. Hereditary benign and malignant lesions of the large bowel. *Cancer*. 1974;34(3):suppl:850-7.
21. Burt RW, DiSario JA, Cannon-Albright L. Genetics of colon cancer: impact of inheritance on colon cancer risk. *Annu Rev Med*. 1995;46:371-9.

22. Sieber OM, Lipton L, Crabtree M, Heinimann K, Fidalgo P, Phillips RK, et al. Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N Engl J Med*. 2003;348(9):791-9.
23. Jenkins MA, Dowty JG, Ait Ouakrim D, Mathews JD, Hopper JL, Drouet Y, et al. Short-term risk of colorectal cancer in individuals with lynch syndrome: a meta-analysis. *J Clin Oncol*. 2015;33(4):326-31.
24. Parry S, Win AK, Parry B, Macrae FA, Gurrin LC, Church JM, et al. Metachronous colorectal cancer risk for mismatch repair gene mutation carriers: the advantage of more extensive colon surgery. *Gut*. 2011;60(7):950-7.
25. Lancaster JM, Powell CB, Chen LM, Richardson DL, Committee SGOCP. Society of Gynecologic Oncology statement on risk assessment for inherited gynecologic cancer predispositions. *Gynecol Oncol*. 2015;136(1):3-7.
26. Lin KM, Shashidharan M, Ternent CA, Thorson AG, Blatchford GJ, Christensen MA, et al. Colorectal and extracolonic cancer variations in MLH1/MSH2 hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindreds and the general population. *Dis Colon Rectum*. 1998;41(4):428-33.
27. Koessler T, Oestergaard MZ, Song H, Tyrer J, Perkins B, Dunning AM, et al. Common variants in mismatch repair genes and risk of colorectal cancer. *Gut*. 2008;57(8):1097-101.
28. American Gastroenterological A. American Gastroenterological Association medical position statement: hereditary colorectal cancer and genetic testing. *Gastroenterology*. 2001;121(1):195-7.
29. Norat T, Bingham S, Ferrari P, Slimani N, Jenab M, Mazuir M, et al. Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(12):906-16.
30. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759-67.

31. Moon BS, Jeong WJ, Park J, Kim TI, Min do S, Choi KY. Role of oncogenic K-Ras in cancer stem cell activation by aberrant Wnt/beta-catenin signaling. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(2):djt373.
32. Spirio LN, Samowitz W, Robertson J, Robertson M, Burt RW, Leppert M, et al. Alleles of APC modulate the frequency and classes of mutations that lead to colon polyps. *Nat Genet.* 1998;20(4):385-8.
33. Mensenkamp AR, Vogelaar IP, van Zelst-Stams WA, Goossens M, Ouchene H, Hendriks-Cornelissen SJ, et al. Somatic mutations in MLH1 and MSH2 are a frequent cause of mismatch-repair deficiency in Lynch syndrome-like tumors. *Gastroenterology.* 2014;146(3):643-6 e8.
34. Cartwright C. Intestinal cell growth control: role of Src tyrosine kinases. *Gastroenterology.* 1998;114(6):1335-8.
35. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(1):1-17.
36. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond).* 2006;110(5):525-41.
37. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004;324(1):17-27.
38. Vainio H, Wilbourn JD, Sasco AJ, Partensky C, Gaudin N, Heseltine E, et al. [Identification of human carcinogenic risks in IARC monographs]. *Bull Cancer.* 1995;82(5):339-48.
39. Munoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol.* 2000;19(1-2):1-5.
40. Vokes EE, Agrawal N, Seiwert TY. HPV-Associated Head and Neck Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2015;107(12):djv344.
41. Bratman SV, Bruce JP, O'Sullivan B, Pugh TJ, Xu W, Yip KW, et al. Human Papillomavirus Genotype Association With Survival in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *JAMA Oncol.* 2016;2(6):823-6.

42. O'Sullivan B, Huang SH, Su J, Garden AS, Sturgis EM, Dahlstrom K, et al. Development and validation of a staging system for HPV-related oropharyngeal cancer by the International Collaboration on Oropharyngeal cancer Network for Staging (ICON-S): a multicentre cohort study. *Lancet Oncol.* 2016;17(4):440-51.
43. De Vuyst H, Clifford GM, Nascimento MC, Madeleine MM, Franceschi S. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. *Int J Cancer.* 2009;124(7):1626-36.
44. McGregor B, Byrne P, Kirgan D, Albright J, Manalo P, Hall M. Confirmation of the association of human papillomavirus with human colon cancer. *Am J Surg.* 1993;166(6):738-40; discussion 41-2.
45. Shah KV, Daniel RW, Simons JW, Vogelstein B. Investigation of colon cancers for human papillomavirus genomic sequences by polymerase chain reaction. *J Surg Oncol.* 1992;51(1):5-7.
46. Munger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol.* 1989;63(10):4417-21.
47. Baldwin A, Li W, Grace M, Pearlberg J, Harlow E, Munger K, et al. Kinase requirements in human cells: II. Genetic interaction screens identify kinase requirements following HPV16 E7 expression in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(43):16478-83.
48. Stefanoff CG, Hassan R, Gonzalez AC, Andrade LA, Tabak DG, Romano S, et al. Laboratory strategies for efficient handling of paraffin-embedded tissues for molecular detection of clonality in non-hodgkin lymphomas. *Diagn Mol Pathol.* 2003;12(2):79-87.
49. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia.* 2003;17(12):2257-317.

50. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol.* 2010;17(6):1471-4.
51. Siegel RL, Fedewa SA, Anderson WF, Miller KD, Ma J, Rosenberg PS, et al. Colorectal Cancer Incidence Patterns in the United States, 1974-2013. *J Natl Cancer Inst.* 2017;109(8).
52. Abou-Zeid AA, Khafagy W, Marzouk DM, Alaa A, Mostafa I, Ela MA. Colorectal cancer in Egypt. *Dis Colon Rectum.* 2002;45(9):1255-60.
53. Alici S, Aykan NF, Sakar B, Bulutlar G, Kaytan E, Topuz E. Colorectal cancer in young patients: characteristics and outcome. *Tohoku J Exp Med.* 2003;199(2):85-93.
54. Isbister WH. Colorectal cancer below age 40 in the Kingdom of Saudi Arabia. *Aust N Z J Surg.* 1992;62(6):468-72.
55. Han-Shiang C. Curative resection of colorectal adenocarcinoma: multivariate analysis of 5-year follow-up. *World J Surg.* 1999;23(12):1301-6.
56. Liu F, Mou X, Zhao N, Lin J, Teng L, Xiang C. Prevalence of human papillomavirus in Chinese patients with colorectal cancer. *Colorectal Dis.* 2011;13(8):865-71.
57. Yavuzer D, Karadayi N, Salepci T, Baloglu H, Dabak R, Bayramicli OU. Investigation of human papillomavirus DNA in colorectal carcinomas and adenomas. *Med Oncol.* 2011;28(1):127-32.
58. Taherian H, Tafvizi F, Fard ZT, Abdirad A. Lack of association between human papillomavirus infection and colorectal cancer. *Prz Gastroenterol.* 2014;9(5):280-4.
59. Gornick MC, Castellsague X, Sanchez G, Giordano TJ, Vinco M, Greenson JK, et al. Human papillomavirus is not associated with colorectal cancer in a large international study. *Cancer Causes Control.* 2010;21(5):737-43.
60. Gazzaz F, Mosli MH, Jawa H, Sibiany A. Detection of human papillomavirus infection by molecular tests and its relation to colonic polyps and colorectal cancer. *Saudi Med J.* 2016;37(3):256-61.

61. Burnett-Hartman AN, Feng Q, Popov V, Kalidindi A, Newcomb PA. Human papillomavirus DNA is rarely detected in colorectal carcinomas and not associated with microsatellite instability: the Seattle colon cancer family registry. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2013;22(2):317-9.
62. Baandrup L, Thomsen LT, Olesen TB, Andersen KK, Norrild B, Kjaer SK. The prevalence of human papillomavirus in colorectal adenomas and adenocarcinomas: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer.* 2014;50(8):1446-61.
63. O'Connell JB, Maggard MA, Liu JH, Etzioni DA, Livingston EH, Ko CY. Do young colon cancer patients have worse outcomes? *World J Surg.* 2004;28(6):558-62.
64. Dozois EJ, Boardman LA, Suwanthanma W, Limburg PJ, Cima RR, Bakken JL, et al. Young-onset colorectal cancer in patients with no known genetic predisposition: can we increase early recognition and improve outcome? *Medicine (Baltimore).* 2008;87(5):259-63.
65. Koulos J, Symmans F, Chumas J, Nuovo G. Human papillomavirus detection in adenocarcinoma of the anus. *Mod Pathol.* 1991;4(1):58-61.
66. Boguszakova L, Hirsch I, Brichacek B, Faltyn J, Fric P, Dvorakova H, et al. Absence of cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, and papillomavirus DNA from adenoma and adenocarcinoma of the colon. *Acta Virol.* 1988;32(4):303-8.
67. Damin DC, Ziegelmann PK, Damin AP. Human papillomavirus infection and colorectal cancer risk: a meta-analysis. *Colorectal Dis.* 2013;15(8):e420-8.
68. Damin DC, Caetano MB, Rosito MA, Schwartzmann G, Damin AS, Frazzon AP, et al. Evidence for an association of human papillomavirus infection and colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2007;33(5):569-74.
69. Perez LO, Barbisan G, Ottino A, Pianzola H, Golijow CD. Human papillomavirus DNA and oncogene alterations in colorectal tumors. *Pathol Oncol Res.* 2010;16(3):461-8.
70. de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol.* 1995;76 (Pt 4):1057-62.

71. Morshed K, Polz-Dacewicz M, Szymanski M, Smolen A. Usefulness and efficiency of formalin-fixed paraffin-embedded specimens from laryngeal squamous cell carcinoma in HPV detection by IHC and PCR/DEIA. *Folia Histochem Cytobiol.* 2010;48(3):398-402.
72. Iftner T, Germ L, Swoyer R, Kjaer SK, Breugelmans JG, Munk C, et al. Study comparing human papillomavirus (HPV) real-time multiplex PCR and Hybrid Capture II INNO-LiPA v2 HPV genotyping PCR assays. *J Clin Microbiol.* 2009;47(7):2106-13.
73. Odida M, de Sanjose S, Sandin S, Quiros B, Alemany L, Lloveras B, et al. Comparison of human papillomavirus detection between freshly frozen tissue and paraffin embedded tissue of invasive cervical cancer. *Infect Agent Cancer.* 2010;5:15.
74. Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985;130(1):118-26.
75. Hill AB. The Environment and Disease: Association or Causation? *Proc R Soc Med.* 1965;58:295-300.
76. Burnett-Hartman AN, Newcomb PA, Potter JD. Infectious agents and colorectal cancer: a review of *Helicobacter pylori*, *Streptococcus bovis*, JC virus, and human papillomavirus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(11):2970-9.
80. Ministério da Saúde: incidence and Mortality in Brazil. Instituto Nacional do Câncer (INCA), Ministério da Saúde, Brasília 2016